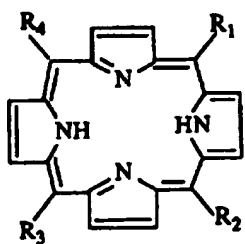
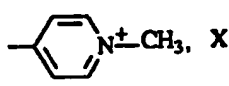
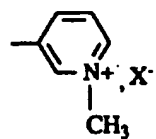
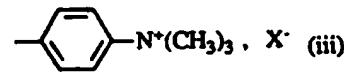


PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ

WO 9605862A1

|   |   |  |
|---|---|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br><b>A61K 41/00, 31/40, 31/44</b>  | <b>A1</b>   | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/05862</b><br>(43) Date de publication internationale: 29 février 1996 (29.02.96) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01096</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 août 1995 (17.08.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:<br/>94/10146 19 août 1994 (19.08.94) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): L'OREAL [FR/FR]; 14, rue Royale, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et<br/>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JORI, Giulio [IT/IT]; Via Cavalieri, 18, I-35100 Padova (IT). BERTOLONI, Giulio [IT/IT]; Via Panica, 6, I-36063 Marostica (IT). MERCHAT, Michèle [FR/FR]; Le Vanel, F-30160 Gagnières (FR). GIACOMONI, Paolo [FR/FR]; 7 bis, rue des Pommiers, F-91400 Orsay (FR).</p> <p>(74) Mandataire: STALLA-BOURDILLON, Bernard; Nony &amp; Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).</p>  | <p>(81) Etats désignés: AU, BR, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Publiée</b><br/>Avec rapport de recherche internationale.<br/>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p> |  |
| <p>(54) Title: USE OF PORPHINE CATIONIC DERIVATIVE SALTS AS GRAM-NEGATIVE BACTERIA PHOTSENSITIZERS</p> <p>(54) Titre: UTILISATION DE SELS DE DERIVES CATIONIQUES DE PORPHINE COMME AGENTS PHOTOSENSIBILISANTS DE BACTERIES DE TYPE GRAM-NEGATIF</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Use of porphine cationic derivative salts as gram-negative bacteria photosensitizers. These salts are of general formula (I) in which R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, which are the same or different, are a hydrogen atom, a phenyl radical or a radical having one of the formulas (i) (ii), and (iii); X<sup>-</sup> is a monovalent anion with the proviso that one at least of the R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> or R<sub>4</sub> radicals is a radical of formula (i) to (iii) except for R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub>, which are the same and are the radical of formula (i). Contamination of the substrate can be reduced by treating the substrate with a salt of formula (I) and then subjecting it to light irradiation.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Utilisation comme agents photosensibilisants de bactéries de type gram-négatif, de sels de dérivés cationiques de porphine. Ces sels répondent à la formule générale (I), dans laquelle R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical phényle ou un radical ayant l'une des formules (i), (ii), et (iii); X<sup>-</sup> représentant un anion monovalent, sous réserve que l'un au moins des radicaux R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ou R<sub>4</sub> représente l'un des radicaux de formule (i) à (iii) mais à l'exclusion de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> identiques et représentant le radical de formule (i). En traitant un substrat avec un sel de formule (I), puis en le soumettant à une irradiation lumineuse, on peut réduire la contamination de ce substrat.</p> <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>(i)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(ii)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>(iii)</p> </div> </div> |   |  |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | GB | Royaume-Uni                                | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GE | Géorgie                                    | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GN | Guinée                                     | NE | Niger                 |
| BE | Belgique                  | GR | Grèce                                      | NL | Pays-Bas              |
| BF | Burkina Faso              | HU | Hongrie                                    | NO | Norvège               |
| BG | Bulgarie                  | IE | Irlande                                    | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BJ | Bénin                     | IT | Italie                                     | PL | Pologne               |
| BR | Brésil                    | JP | Japon                                      | PT | Portugal              |
| BY | Bélarus                   | KE | Kenya                                      | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | KG | Kirghizistan                               | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KR | République de Corée                        | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KZ | Kazakhstan                                 | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                              | SK | Slovaquie             |
| CM | Cameroun                  | LK | Sri Lanka                                  | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LU | Luxembourg                                 | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | LV | Lettonie                                   | TG | Togo                  |
| CZ | République tchèque        | MC | Monaco                                     | TJ | Tadjikistan           |
| DE | Allemagne                 | MD | République de Moldova                      | TT | Trinité-et-Tobago     |
| DK | Danemark                  | MG | Madagascar                                 | UA | Ukraine               |
| ES | Espagne                   | ML | Mali                                       | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande                  | MN | Mongolie                                   | UZ | Ouzbékistan           |
| FR | France                    |    |  | VN | Viet Nam              |
| GA | Gabon                     |    |  |    |                       |

Utilisation de sels de dérivés cationiques de porphine comme agents  
photosensibilisants de bactéries de type gram-négatif.

La présente invention a pour objet l'utilisation de sels de dérivés cationiques de porphine comme agents photosensibilisants de bactéries de type gram-négatif.

La photosensibilisation de différentes cibles a fait l'objet de nombreuses études.

Ainsi il a été décrit dans "Photodynamic therapy of tumors and other diseases using porphyrins" Spikes, Lasers in Medical Science, vol. 2.3, 1987, l'utilisation d'hémato- porphyrine (Hp), c'est-à-dire d'un dérivé anionique de porphine substitué en positions 7 et 12 par un radical hydroxyéthyle, en 3, 8, 13 et 17 par un radical méthyle et en 2 et 8 par un radical acide propionique pour photosensibiliser des cellules cancéreuses. Il a également été décrit dans cet article, la possibilité de photosensibiliser *in vivo* des virus et en particulier le virus de l'herpès à l'aide d'un dérivé anionique de porphine, la 5,10,15,20 tétra-(4-sulfonatophényl) porphine (TPPS<sub>4</sub>). La photosensibilisation de microorganismes procaryotes ou eucaryotes tels que des champignons, des levures et des bactéries a également été envisagée. S'il est possible de photosensibiliser la plupart de ces microorganismes à l'aide de différents agents photosensibilisants et en particulier de dérivés de porphine, les bactéries de type gram-négatif s'avèrent toutefois totalement résistantes à cette photosensibilisation.

Dans la mesure où la résistance de ces bactéries a été attribuée à la structure particulière de leur enveloppe, il a été envisagé dans "Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria : problems and possible solutions" J. Photochem. Photobiol. B. Biol, 14, 1992, de recourir à un traitement préalable d'altération de leur enveloppe à l'aide soit d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ou d'un agent polycationique de désorganisation de la membrane en vue de réussir à photosensibiliser ces bactéries de type gram-négatif. Ces traitements préalables d'altération de l'enveloppe de chaque bactérie de type gram-négatif que l'on souhaite photosensibiliser sont bien entendu difficiles à mettre en oeuvre et ceci particulièrement à grande échelle et donc peu réalisables en pratique.

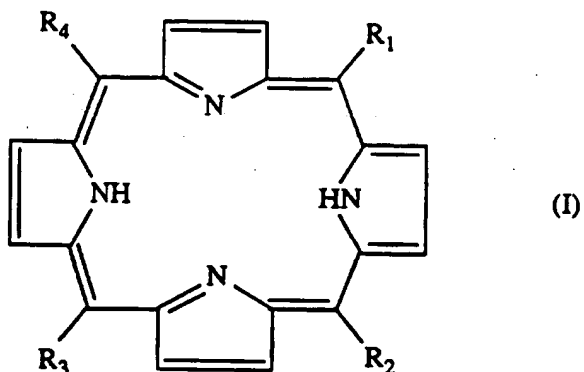
On a maintenant constaté de façon surprenante et inattendue qu'en utilisant une famille particulière de sels de dérivés cationiques de porphine présentant une ou plusieurs substitutions en position(s) 5, 10, 15 et/ou 20 du noyau porphine, il était possible de photosensibiliser des bactéries de type gram-négatif sans avoir recours à un traitement préalable particulier d'altération de l'enveloppe de ces bactéries.

Par enveloppe, on entend selon l'invention la structure externe bien connue des bactéries de type gram-négatif et qui, de façon schématique, est constituée de la membrane cytoplasmique, d'un périplasme comprenant environ en son milieu une couche de muréine, d'une membrane externe formée d'une bicouche de phospholipides et d'une

capsule formée essentiellement de lipopolysaccharides et de lipoprotéines.

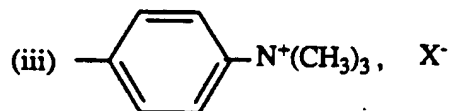
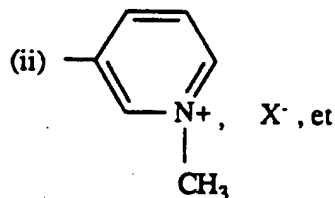
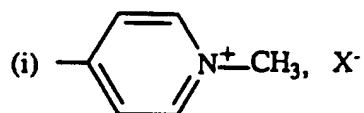
Parmi les bactéries de ce type, on peut citer notamment celles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et notamment les bactéries des genres *Escherichia* telles que *E.coli*, *Enterobacter* telles que *E.aerogenes* et *Proteus* tel que *P.mirabilis*, la famille des *Pseudomonadaceae* et en particulier du genre *Pseudomonas* telles que *Ps.aeruginosa*, la famille des *Vibrionaceae* et en particulier du genre *Vibrio* telles que *V.anguillarum*.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation, comme agent photosensibilisant de bactéries de type gram-négatif, d'un sel de dérivé cationique de porphine, substitué en position 5, 10, 15, et/ou 20 du noyau porphine, répondant à la formule suivante :



dans laquelle :

$R_1, R_2, R_3, R_4$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical phényle ou un radical ayant l'une des formules suivantes :



$X^-$  représentant un anion monovalent,

sous réserve que l'un au moins des radicaux  $R_1, R_2, R_3$  ou  $R_4$  représente l'un des radicaux de formule (i) à (iii) ci-dessus mais à l'exclusion de  $R_1, R_2, R_3$  et  $R_4$  étant

identiques et représentant le radical de formule (i).

Par agent photosensibilisant de bactéries, on entend un agent ayant la capacité, en association avec une irradiation lumineuse, de provoquer ou favoriser la destruction des bactéries.

5 Les sels de dérivés cationiques de porphine utilisés selon l'invention absorbent des radiations de longueur d'onde comprise entre environ 340 nm et 650 nm et donc en particulier à des radiations correspondant au visible dont l'utilisation est particulièrement avantageuse dans la mesure où celles-ci sont facilement disponibles, pénètrent bien dans l'eau et ne sont pas mutagènes.

10 Parmi les sels de dérivés cationiques de porphine de formule (I), on utilise de préférence ceux pour lesquels, deux au moins des radicaux  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ou  $R_4$  représentent un radical ayant une des formules (i) à (iii) telles que définies précédemment.

Selon un mode de réalisation préféré, l'anion monovalent est notamment un anion halogénure tel qu'un anion iodure ou chlorure ou un tosylate.

15 Parmi les sels de dérivés cationiques de porphine répondant à la formule (I) définie ci-dessus, on peut citer en particulier les iodures, chlorures et tosylates de 5,10,15,20-tétra(3-N-méthyl pyridinium) porphine de 5,10-[di(phényl)]-15,20-[di(4-N-méthyl pyridinium)]porphine, de 5,10,15,20-tétra (4-N-triméthyl anilinium)porphine et de 5,15,70-tri(4-méthylpyridinium) 10-(phényl)porphine.

20 Les sels de dérivés cationiques de porphine utilisés selon l'invention sont des composés connus.

Parmi ceux-ci, on peut citer notamment, le tétraiodure de 5,10,15,20-tétra(4-N-triméthyl anilinium)porphine commercialisé sous la dénomination de "Iodure  $T_4MAP$ ", par les Sociétés Alpha Product et Mid Center, le tétrachlorure de 5,10,15,20-tétra (3-N-méthyl pyridinium)porphine commercialisé sous la dénomination de "Chlorure  $T_3MPyP$ " par la Société Mid Center, le tétrachlorure de 5,10-[di(phényl)]-15,20-[di(4-N-méthyl pyridinium)] porphine commercialisé sous la dénomination de "Chlorure  $D_2PhD_2MPyP$ " par la Société Mid Center et le tritosylate de 5,15,20-tri(4-N-méthyl pyridinium) 10-(phényl) porphine commercialisé sous la dénomination de "Tosylate  $T_3MPyPhP$ ".

30 On peut également utiliser les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment comme agents photosensibilisants de bactéries de type gram-positif, de virus ou de cellules eucaryotes telles que des levures.

35 S'il est possible selon l'invention d'utiliser directement les sels de dérivés cationiques de porphine, il est également possible de les utiliser après immobilisation sur un support solide, par exemple par établissement d'une liaison covalente par l'intermédiaire de groupes réactifs présents sur le support solide, ou par l'intermédiaire

d'un bras espaceur, selon les méthodes connues de l'état de la technique.

Selon l'invention, ce type de fixation peut être notamment envisagé lorsque l'un au moins et trois au plus des radicaux  $R_1$  à  $R_4$  représente un radical p-anilino et lorsque le support solide est porteur de fonctions acides carboxyliques.

5 Le dérivé de porphine dont l'un au moins et trois au plus des radicaux  $R_1$  à  $R_4$  représente un radical de formule (iii) est alors fixé sur le support par l'intermédiaire d'au moins une fonction amide.

10 D'autres méthodes de fixation de dérivés de porphine sur des supports solides sont possibles par l'intermédiaire de groupes réactifs susceptibles d'être introduits soit sur les noyaux pyrroles soit sur l'un au moins des substituants  $R_1$  à  $R_4$  et ceci en fonction de la nature des groupes réactifs présents sur le support solide.

Comme supports solides porteurs de fonctions acides carboxyliques, on peut notamment citer les résines vendues sous les dénominations de "Amberlite IRC50"®, "Ionac CGC-270"®, "Rexyn 102"® et "Permuit H 70"®.

15 Ces supports peuvent se présenter sous différentes formes telles que des plaques, poreuses ou non, des billes de différents diamètres ou sous toutes autres formes particulières.

20 Les sels de dérivés cationiques de porphine peuvent être également fixés à un récipient laissant passer la lumière, et ainsi être avantageusement utilisés en tant qu'agent conservateur de différentes compositions contenues dans ledit récipient, la composition après prélèvement étant à la fois exempte de toute contamination, en particulier par des bactéries de type gram-négatif mais également de sels de dérivés cationiques de porphine.

25 Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à traiter des infections comprenant ou susceptibles de comprendre des bactéries de type gram-négatif.

Parmi les infections comprenant des bactéries de type gram-négatif, on peut citer notamment des affections génitales impliquant notamment *E.coli* et des affections dermatologiques telles que celles provoquées par *Ps.aeruginosa*.

30 Par infection susceptible de comprendre des bactéries de type gram-négatif, on entend toute infection dans laquelle la présence de bactéries de type gram-négatif peut être raisonnablement suspectée.

35 Dans la mesure où les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment photosensibilisent également des bactéries de type gram-positif, la composition thérapeutique ainsi obtenue présente un large spectre d'action. Cette composition peut être utilisée de façon particulièrement avantageuse pour traiter des infections dont les agents infectieux sont devenus résistants aux traitements classiques et

en particulier aux antibiotiques.

Cette composition thérapeutique peut être administrée par voie interne, entérale ou parentérale, ou par voie externe. Cependant, elle est de préférence administrée par voie externe.

5 Selon cette dernière, les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment sont généralement appliqués en une quantité comprise entre environ  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  à  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de tissus à traiter et de préférence comprise entre 10 et  $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Les compositions thérapeutiques contiennent dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable les sels de dérivés cationiques de porphine selon  
10 l'invention en une quantité suffisante pour l'application recherchée.

Parmi ceux-ci, on utilise avantageusement dans les compositions à application topique, des solvants qui ont la particularité de ne pénétrer que dans l'épiderme.

Comme solvants présentant cette caractéristique, on peut notamment citer le diméthyl sulfoxyde (DMSO), les solutions hydroalcooliques composées d'un mélange  
15 d'éthanol et d'eau dans un rapport volume à volume compris entre 9 : 1 et 6 : 4 et les solutions de propylène carbonatées stabilisées par des résines d'hydroxypropylcellulose.

On peut également utiliser une composition à application topique commercialisée sous la dénomination d'"azone"® par la Société O.R.D. Inc.

Les compositions thérapeutiques à application topique peuvent notamment se  
20 présenter sous forme de dispersions aqueuses de liposomes contenant au sein de leur couche lipidique les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment ou bien encore se présenter sous forme de solutions de sels de dérivés cationiques de porphines.

Dans la mesure où la destruction de l'agent infectieux requiert la présence de  
25 lumière, le site d'action de la composition thérapeutique comprenant les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment, est essentiellement localisé à la partie superficielle de l'individu à traiter. Toutefois, les sels de dérivés cationiques de porphine selon l'invention sensibilisent leur cible notamment à des radiations de longueur d'onde de l'ordre de 650 nm, ces dernières présentant un coefficient de pénétration dans  
30 les tissus de mammifère relativement élevés. L'énergie résiduelle, à deux centimètres de la surface de la peau, étant suffisante pour obtenir l'effet recherché, il est donc possible de traiter des sites situés à cette profondeur. Il suffit alors pour l'obtention de l'effet recherché d'éclairer la zone à traiter.

Il est également possible d'éclairer la zone à traiter à l'aide de fibres optiques.  
35 Ceci peut être notamment utilisé pour le traitement des muqueuses vaginales ainsi que des muqueuses pulmonaires.

On applique la composition sur le tissu à traiter puis, irradie six heures après la

zone à traiter par de la lumière de longueur d'onde comprise entre 550 et 650 nm à raison d'environ 180 m watts/cm<sup>2</sup> pour une dose totale de l'ordre de 100 joules/cm<sup>2</sup>.

5 L'irradiation par des longueurs d'onde comprises entre 550 et 650 nm confère au traitement à l'aide des compositions thérapeutiques telles que définies précédemment une innocuité particulièrement satisfaisante. En effet, ces longueurs d'onde ne sont pas absorbées par les cellules de l'épiderme et ne présentent donc pas de toxicité vis-à-vis de celles-ci.

10 La présente invention a également pour objet un procédé de réduction de la contamination, notamment de la contamination bactérienne, d'un substrat comprenant les étapes consistant à :

(i) mettre ledit substrat en présence d'une quantité efficace d'au moins un sel de dérivé cationique de porphine tel que défini précédemment, et

(ii) soumettre ledit substrat à de la lumière de longueur d'onde comprise entre 340 et 650 nm.

15 S'il est souhaitable dans le procédé tel que décrit précédemment que les sels de dérivés cationiques de porphine soient présents lorsque le substrat est soumis à la lumière, il n'est toutefois pas nécessaire que chaque contaminant dont on souhaite la destruction soit en contact direct avec un sel de dérivé cationique de porphine.

20 La distance entre un contaminant que l'on souhaite photosensibiliser et un sel de dérivé cationique de porphine est généralement inférieure ou égale à 2 mm et de préférence inférieure à 1 mm.

25 Par quantité efficace, on entend une quantité capable de réduire le taux de contamination du substrat traité en-dessous d'un seuil prédéterminé. Cette quantité peut être déterminée dans chaque cas par des expériences de routine. Cette quantité dépend évidemment du volume de substrat à traiter lorsque celui-ci est liquide ou gazeux, ou de la surface de substrat à traiter lorsque celui-ci est solide. Par exemple, pour des substrats liquides ou gazeux, on utilise une quantité généralement supérieure à 1 µg/ml et en particulier supérieure à 10 µg/ml.

30 Pour des substrats solides, on utilise généralement une quantité supérieure à 10 µg/cm<sup>2</sup> et en particulier supérieure à 20 µg/cm<sup>2</sup>.

De préférence, pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, on met en contact le substrat à traiter avec l'agent photosensibilisant, pendant un temps suffisant qui peut être déterminé dans chaque cas par des expériences de routine.

35 Le temps durant lequel le substrat est mis en présence d'au moins un sel de dérivé cationique de porphine dans l'étape (i) est généralement compris entre 2 minutes et 60 minutes et de préférence supérieur ou égal à environ 5 minutes. Cette étape est réalisée de préférence en absence de lumière.



Le temps durant lequel le substrat contenant les sels de dérivés cationiques de porphine est exposé à la lumière selon l'étape (ii) est généralement supérieur ou égal à environ 15 minutes et de préférence supérieur ou égal à environ 30 minutes.

Toutefois, celui-ci peut être modulé en fonction de l'intensité de la lumière à laquelle est soumis le substrat.

Comme source lumineuse, on peut utiliser toute source lumineuse émettant à au moins une longueur d'onde comprise entre 340 et 650 nm. Bien entendu, la lumière utilisée peut être complexe et comprendre différentes radiations de longueurs d'onde comprises dans l'intervalle défini précédemment mais peut également comprendre des radiations de longueur d'onde inférieure à 340 nm ou supérieure à 650 nm, celles-ci n'étant évidemment pas ou peu absorbées par les sels de dérivés cationiques de porphine. On utilise notamment une lumière blanche et en particulier de la lumière naturelle.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de réduction de la contamination d'un substrat tel que défini précédemment, les sels de dérivés cationiques de porphine utilisés dans la première étape, c'est-à-dire l'étape (i), sont sous forme immobilisée sur un support solide. On peut ainsi facilement séparer ensuite le substrat décontaminé du support solide et réutiliser ce dernier dans un nouveau cycle de décontamination.

Les substrats pouvant être traités par le procédé tel que défini précédemment, peuvent être tout produit (ou mélange de produits) liquide, gazeux ou solide susceptible d'être contaminé, notamment par des bactéries de type gram-négatif.

Parmi les substrats solides, on peut citer par exemple des récipients et en particulier ceux constitués par un matériau thermosensible. La première étape du procédé de décontamination de ce type de substrat peut être réalisée par immersion dans une suspension de sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment ou par contact avec un support solide sur lequel sont immobilisés des sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment.

Parmi les substrats liquides, on peut citer diverses solutions et dispersions, de viscosité variable, ainsi que de l'eau. La première étape du procédé de décontamination de ce type de substrat peut être réalisée par addition des sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment ou par immersion d'un support solide sur lequel sont immobilisés des sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment.

Par le procédé tel que décrit précédemment, on peut ainsi réduire la contamination de l'eau utilisée en aquaculture, de l'eau de piscine, mais également décontaminer des effluents industriels et même obtenir de l'eau potable.

La mise en oeuvre du procédé tel que décrit précédemment est généralement

réalisée en circuit fermé, ce circuit comprenant une pompe, des filtres mécaniques tel que des tamis ou du sable permettant d'éliminer les matières volumineuses en suspension, des résines sur lesquelles sont fixés les sels de dérivés cationiques de porphine tels que définis précédemment et des lampes.

- 5 La première étape du procédé de décontamination, dans le cas d'un substrat de type gazeux peut être notamment réalisée par la mise en présence de ce substrat avec des sels de dérivés cationiques de porphine immobilisés tels que définis précédemment. Selon un mode de réalisation particulier, le substrat gazeux est mis en présence de sels de dérivés cationiques de porphine dans un récipient clos. Selon un autre mode de réalisation, on fait circuler le gaz à traiter de façon qu'il vienne au contact d'un support solide sur lequel sont immobilisés les sels de dérivés cationiques de porphine.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

Dans ceux-ci les abréviations suivantes ont pour signification :

- 15  $T_3MPyPhP$  = tritosylate de 5,15,20-tri(4-N-méthyl pyridinium)-10-(phényl)porphine

$T_4MAP$  = tétraiodure de 5,10,15,20-tétra(4-N-triméthyl anilinium)porphine

Hp = hématoporphyrine

$TPPS_4$  = 5,10,15,20-tétra(4-sulfonatophényl)porphine

20 **EXEMPLE 1 : Effet de l'irradiation par de la lumière visible après photosensibilisation par  $T_3MPyPhP$**

- A 10 ml d'un tampon phosphate salin (PBS), contenant  $10^7$  cellules/ml d'*E.coli*, on ajoute 100 µg de  $T_3MPyPhP$ . Le mélange ainsi obtenu est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 5 minutes.

- 25 On effectue alors sur la suspension une première mesure du pourcentage de cellules survivantes par prélèvement de 200 µl de la suspension, éventuellement dilution puis étalement de 50 µl de la suspension ou de l'une de ses dilutions, sur un milieu nutritif approprié stérile de type BHI (commercialisé par la Société Difco) + agar 1,5 %, incubation à 37°C pendant 24 heures puis dénombrement des colonies formées.

30 Selon le même mode opératoire que décrit précédemment, on réalise également des suspensions de *E.seriolicida*, de *V.anguillarum* dans un tampon salin à 2 % de NaCl que l'on incube à température ambiante pendant 5 minutes.

- 35 Selon le même mode opératoire que décrit précédemment, on effectue également une première mesure du pourcentage de cellules survivantes, le milieu de culture étant toutefois supplémenté en NaCl (1,5 %) et l'incubation ayant lieu à 20°C au lieu de 37°C.

D'autre part, chaque suspension, maintenue à la température utilisée pour l'incubation, est irradiée par de la lumière visible ( $8 \text{ mwatts/cm}^2$ ) à l'aide de 4 lampes au tungstène 250 w de type Osram, c'est-à-dire émettant à des longueurs d'onde comprises entre 380 nm et 800 nm.

5 Le pourcentage de cellules survivantes mesuré selon le même mode opératoire que décrit précédemment, est déterminé après 1, 15 et 30 minutes d'irradiation.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 1.

10 On constate donc d'après la figure 1 que l'incubation en présence de  $T_3\text{MPyPhP}$  suivie d'une irradiation par de la lumière visible réduit le pourcentage de cellules survivantes que ce soit pour des bactéries de type gram-négatif comme le montrent les courbes obtenues sur des suspensions de *V.anguillarum* et *E.coli*, ou pour des bactéries de type gram positif comme le montre la courbe obtenue sur une suspension de *E.seriolicida*.

15 Des essais parallèles ont été réalisés selon un mode opératoire analogue à celui décrit précédemment mais sans irradiation des suspensions par la lumière visible. Aucun effet cytotoxique n'a pu être détecté tant sur les suspensions de bactéries de type gram positif (*E.seriolicida*) que sur les suspensions de bactéries de type gram-négatif (*E.coli* et *V.anguillarum*)

La réduction du pourcentage de cellules survivantes observée résulte par conséquent d'une photosensibilisation.

20

**EXEMPLE 2 : Effet de l'irradiation par de la lumière visible après  
photosensibilisation par  $T_4\text{MAP}$**

25 Selon le même mode opératoire que décrit à l'exemple 1, on a mis en évidence la photosensibilisation de bactéries de type gram-négatif (*V.anguillarum*) et de bactéries de type gram positif (*E.seriolicida*) par  $T_4\text{MAP}$ .

Les résultats sont présentés dans la figure 2.

30 On constate selon la figure 2 que l'incubation en présence de  $T_4\text{MAP}$  suivie d'une irradiation par de la lumière visible réduit le pourcentage de cellules survivantes, que les bactéries soient de type gram-négatif ou qu'elles soient de type gram positif.

$T_4\text{MAP}$  photosensibilise donc les bactéries de type gram positif et de type gram-négatif.

35

**EXEMPLE 3 : Comparatifs**

Selon le même mode opératoire que décrit à l'exemple 1, on a réalisé des expériences de photosensibilisation à l'aide de TPPS<sub>4</sub> commercialisé sous cette  
5 dénomination par la Société Mid Center (figure 3) et de Hp commercialisé sous la dénomination de "Hematoporphyrine IX dihydrochlorure"® par les Sociétés Mid Center et Alpha Product (figure 4).

Selon la figure 3, on constate que lorsqu'on incube une suspension de *E.coli* en présence de TPPS<sub>4</sub>, le pourcentage de cellules survivantes après irradiation reste constant  
10 tandis que l'incubation d'une suspension de *E.seriolicida* en présence de TPPS<sub>4</sub> entraîne après irradiation une diminution du pourcentage de cellules survivantes.

TPPS<sub>4</sub> qui est un dérivé anionique de porphine ne photosensibilise donc que des bactéries de type gram positif.

De même, selon la figure 4, on constate que l'incubation en présence de Hp  
15 suivie d'une irradiation par de la lumière visible entraîne une diminution du pourcentage de cellules survivantes dans une suspension de *E.seriolicida* (gram positif), tandis que le pourcentage de cellules survivantes mesuré à partir d'une suspension de *V.anguillarum* (gram-négatif) ne présente aucune diminution.

Hp qui est un dérivé anionique de porphine substitué en positions 7 et 12 par un radical hydroxyéthyle, en 3, 8, 13 et 17 par un radical méthyle et en 2 et 8 par un radical acide propionique ne photosensibilise donc que des bactéries de type gram positif.  
20

Il apparait donc que seuls les sels de dérivés cationiques de porphine substitués en position 5, 10, 15 et/ou 20 selon l'invention sont capables de photosensibiliser non  
25 seulement des bactéries de type gram positif, mais également des bactéries de type gram-négatif.

30

35

**EXEMPLE 4 : Effet de l'irradiation par de la lumière visible sur différentes souches bactériennes incubées en présence de différents dérivés de porphine**

**1) Bactéries de type gram positif :**

5

**a) E.seriolicida**

10

A 10 ml d'une solution de NaCl 2 % contenant  $10^7$  cellules/ml de *E.seriolicida*, on ajoute, à température ambiante 100 µg de T<sub>3</sub>MPyPhP. Après une incubation à l'obscurité, à température ambiante, pendant 5 minutes, on irradie à 20°C pendant 30 minutes la suspension par de la lumière visible (8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4 lampes au tungstène, 250 w de type Osram, c'est-à-dire émettant à des longueurs d'onde comprises entre 380 nm et 800 nm. On mesure alors le pourcentage de cellules survivantes selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

15

Selon le même mode opératoire que décrit précédemment, on incube des suspensions de *E.seriolicida* en présence de Hp, T<sub>4</sub>MAP ou de TPPS<sub>4</sub>. Ces suspensions sont ensuite irradiées.

**b) S.epidermidis**

20

A 10 ml d'un tampon phosphate salin contenant  $10^7$  cellules/ml de *S.epidermidis*, on ajoute, à température ambiante, 100 µg de T<sub>3</sub>MPyPhP. Après incubation à l'obscurité, à température ambiante, pendant 5 minutes, on irradie à 37°C pendant 30 minutes, la suspension par de la lumière visible b(8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4 lampes au tungstène, 250 w, de type Osram. On effectue alors une mesure du pourcentage de cellules survivantes selon le même mode opératoire que décrit à l'exemple 1.

25

**2) Bactéries de type gram-négatif :**

30

**a) V.anguillarum**

35

A 10 ml d'une solution de NaCl 2 % contenant  $10^7$  cellules/ml de *V.anguillarum*, à température ambiante, on ajoute 100 µg de T<sub>3</sub>MPyPhP, puis incube la suspension ainsi obtenue pendant 5 minutes à l'obscurité à température ambiante. On irradie alors pendant 30 minutes la suspension, à 20°C, par de la lumière visible (8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4 lampes au tungstène, 250 w, de type Osram, c'est-à-dire émettant à des longueurs d'onde comprises entre 380 nm et 800 nm. On mesure alors le

pourcentage de cellules survivantes selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

Selon le même mode opératoire que décrit précédemment, on évalue également la photosensibilisation de suspensions de *V.anguillarum* en présence soit de T<sub>4</sub>MAP soit de TPPS<sub>4</sub>.

- 5 En outre, on étudie également la photosensibilisation d'une suspension de *V.anguillarum* ayant subi un prétraitement par du CaCl<sub>2</sub> puis incubation en présence de Hp. Pour ce faire, à 10 ml d'une solution CaCl<sub>2</sub>, contenant 10<sup>7</sup> cellules/ml de *V.anguillarum*, incubée à 20°C pendant 1 heure, on ajoute 100 µg de Hp. Puis on incube la suspension ainsi obtenue pendant 5 minutes à l'obscurité, l'irradie selon le mode  
10 opératoire décrit à l'exemple 1.

b) *E.coli*

- 15 A 10 ml d'une solution de tampon phosphate salin contenant 10<sup>7</sup> cellules/ml de *E.coli*, à température ambiante, on ajoute 100 µg de T<sub>3</sub>MPyPhP, puis incube la suspension ainsi obtenue pendant 5 minutes à l'obscurité. On irradie alors la suspension, à 37°C pendant 30 minutes, par de la lumière visible (8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4 lampes au tungstène, 250 w, de type Osram. On mesure alors le pourcentage de cellules survivantes selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

- 20 Selon le mode opératoire décrit précédemment, on évalue également la photosensibilisation d'une suspension de *E.coli* en présence de TPPS<sub>4</sub>.

c) *E.aerogenes*

- 25 A 10 ml d'une solution de tampon phosphate salin contenant 10<sup>7</sup> cellules/ml de *E.aerogenes*, on ajoute à température ambiante 100 µg de T<sub>4</sub>MAP, puis incube la suspension ainsi obtenue pendant 5 minutes à l'obscurité. On irradie alors pendant 30 minutes la suspension, à 37°C, par de la lumière visible (8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4 lampes au tungstène, 250 w, de type Osram. On mesure alors le pourcentage de cellules  
30 survivantes selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

d) *P.mirabilis*

- 35 A 10 ml d'une solution de tampon phosphate salin contenant 10<sup>7</sup> cellules/ml de *P.mirabilis*, à température ambiante, on ajoute 100 µg de T<sub>4</sub>MAP, puis incube la suspension ainsi obtenue pendant 5 minutes à l'obscurité. On irradie alors pendant 30 minutes la suspension, à 37°C, par de la lumière visible (8 mwatts/cm<sup>2</sup>) à l'aide de 4

lampes au tungstène, 250 w, de type Osram. On mesure alors le pourcentage de cellules survivantes selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

TABLEAU 1

Pourcentage de bactéries survivantes après 30 minutes d'irradiation  
par de la lumière visible, en présence de divers agents  
photosensibilisants (10 µg/ml)

| Dérivés de porphine * |                      | Hp<br>10 µg/ml   | TPPS <sub>4</sub><br>10 µg/ml | T <sub>4</sub> MAP<br>10 µg/ml | T <sub>3</sub> MPyPhP<br>10 µg/ml |
|-----------------------|----------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Gram +                | <i>E.seriolicida</i> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-3</sup>              | 10 <sup>-7</sup>               | 4.10 <sup>-3</sup> (10 mm)        |
|                       | <i>S.agalactiae</i>  | -                | -                             | 10 <sup>-4</sup>               | -                                 |
|                       | <i>S.epidermidis</i> | -                | -                             | -                              | -                                 |
| Gram -                | <i>V.anguillarum</i> | ** 10            | > 10                          | 1                              | 10 <sup>-6</sup>                  |
|                       | <i>E.coli</i>        | -                | > 10                          | -                              | 10 <sup>-3</sup>                  |
|                       | <i>E.aerogenes</i>   | -                | -                             | 10 <sup>-4</sup>               | -                                 |
|                       | <i>P.mirabilis</i>   | -                | -                             | 1                              | -                                 |

\*\* prétraitement par incubation en présence de CaCl<sub>2</sub>

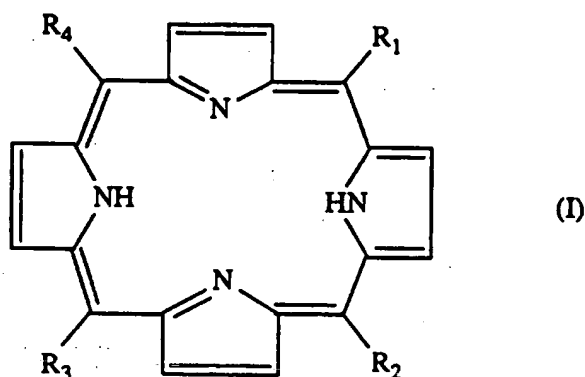
D'après le tableau ci-dessus, on constate donc que quelque soit le dérivé de porphine utilisé, l'incubation d'une suspension de bactérie de type gram positif avec l'un de ces dérivés, suivie d'une irradiation par de la lumière visible entraîne une diminution importante du pourcentage de cellules survivantes.

Par contre, lorsque les souches bactériennes testées sont de type gram-négatif, seules les sels de dérivés cationiques de porphine selon l'invention permettent d'obtenir après irradiation un pourcentage de cellules survivantes inférieur à 10 %. On peut d'ailleurs noter que lorsque les bactéries de type gram-négatif ont été prétraitées par du CaCl<sub>2</sub>, incubées en présence de Hp, puis irradiées par de la lumière visible, le pourcentage de cellules survivantes est encore de 10 %.

Il apparait donc que seuls les sels de dérivés cationiques de porphine selon l'invention photosensibilisent efficacement les bactéries de type gram-négatif.

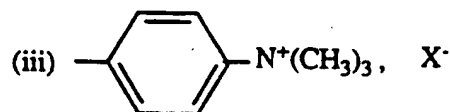
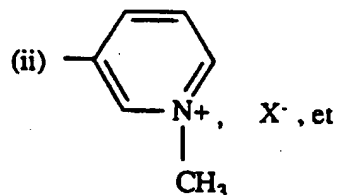
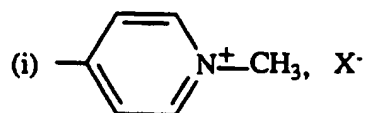
**REVENDICATIONS**

1. Utilisation comme agent photosensibilisant de bactéries de type gram-négatif, d'un sel de dérivé cationique de porphine répondant à la formule générale suivante :



15 dans laquelle :

$R_1, R_2, R_3, R_4$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical phényle ou un radical ayant l'une des formules suivantes :



30  $X^-$  représentant un anion monovalent,

sous réserve que l'un au moins des radicaux  $R_1, R_2, R_3$  ou  $R_4$  représente l'un des radicaux de formule (i) à (iii) mais à l'exclusion de  $R_1, R_2, R_3$  et  $R_4$  étant identiques et représentant le radical de formule (i).

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'au moins deux des radicaux  $R_1, R_2, R_3$  et  $R_4$  représentent un des radicaux de formule (i) à (iii) telle que définie dans la revendication 1.

35



3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par le fait que ledit anion monovalent est un anion halogénure, choisi parmi un anion iodure ou chlorure ou un anion tosylate.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit sel de dérivé cationique de porphine de formule (I) est choisi parmi les iodures, chlorures ou tosylates de 5,10, 15,20-tétra (3N-méthyl pyridinium) porphine, de 15,20-[di(phényl)]- 5,10-[di(4N-méthyl pyridinium)] porphine de 5,10,15,20-tétra(4N-triméthyl anilinium)porphine et de 5,15,20-tri(4-méthyl pyridinium) 10-(phényl)porphine.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendication précédentes, caractérisée par le fait que ledit sel de dérivé cationique de porphine est également un agent capable de photosensibiliser des bactéries de type gram-positif, des virus et des levures.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit sel de dérivé cationique de porphine est immobilisé sur un support solide.

7. Utilisation d'un sel de dérivé cationique de porphine tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'une composition thérapeutique destinée à traiter des infections comprenant ou susceptible de comprendre des bactéries de type gram-négatif.

8. Procédé de réduction de la contamination d'un substrat caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes consistant à :

(i) mettre ledit substrat en présence d'une quantité efficace d'au moins un sel de dérivé cationique de porphine tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4, et

(ii) soumettre ledit substrat à de la lumière de longueur d'onde comprise entre 340 nm et 650 nm.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que la quantité de sels de dérivés cationiques de porphine est supérieure à 1 µg/ml de substrat liquide ou gazeux à décontaminer.

10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que la quantité de sels de dérivés cationiques de porphine est supérieure à 10 µg/cm<sup>2</sup> de surface de substrat solide à décontaminer.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé par le fait que dans l'étape (i), le temps durant lequel ledit substrat est mis en présence d'au moins un sel de dérivé cationique de porphine est compris entre 2 minutes et 60 minutes.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que ledit temps durant lequel ledit substrat est mis en présence d'au moins un sel de dérivé cationique de porphine est supérieur ou égal à environ 5 minutes.

5 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé par le fait que dans l'étape (ii), le temps d'exposition dudit substrat à de la lumière est supérieur ou égal à environ 15 minutes.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé par le fait que ledit temps d'exposition est supérieur ou égal à environ 30 minutes.

10 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé par le fait que la lumière utilisée à l'étape (ii) est de la lumière blanche.

15

20

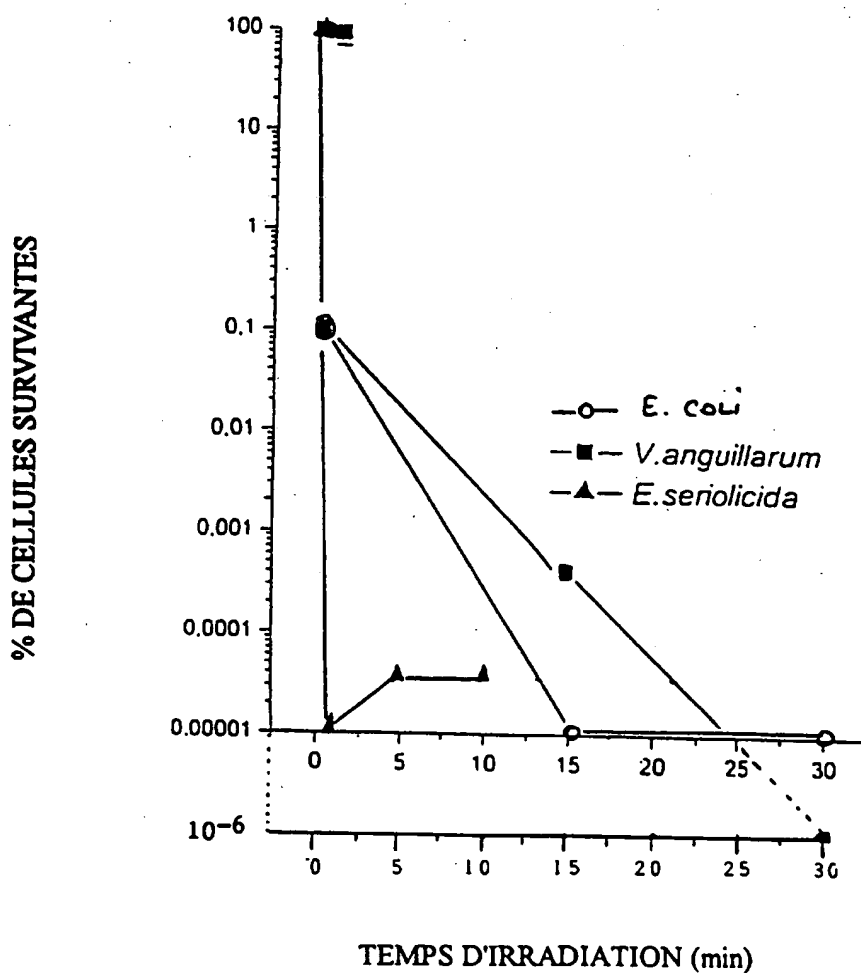
25

30

35

FIGURE 1

EFFET SUR DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES DE L'IRRADIATION  
PAR DE LA LUMIERE VISIBLE APRES 5 MINUTES D'INCUBATION A  
L'OBSCURITE EN PRESENCE DE  $T_3MPyPhP$  (10  $\mu g/ml$ )



- 2/4 -

FIGURE 2

EFFET SUR DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES DE L'IRRADIATION  
PAR DE LA LUMIERE VISIBLE APRES 5 MINUTES D'INCUBATION A  
L'OBSCURITE EN PRESENCE DE T<sub>4</sub>MAP (10 µg/ml)

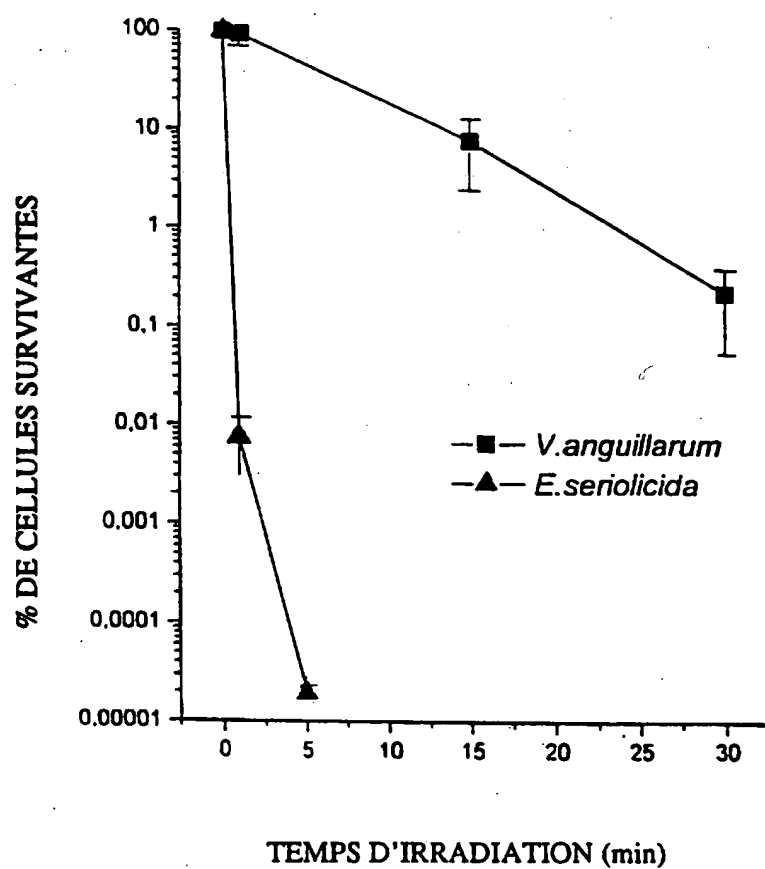


FIGURE 3

EFFET SUR DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES DE L'IRRADIATION  
PAR DE LA LUMIERE VISIBLE APRES 5 MINUTES D'INCUBATION A  
L'OBSCURITE EN PRESENCE DE TPPS<sub>4</sub> (10 µg/ml)

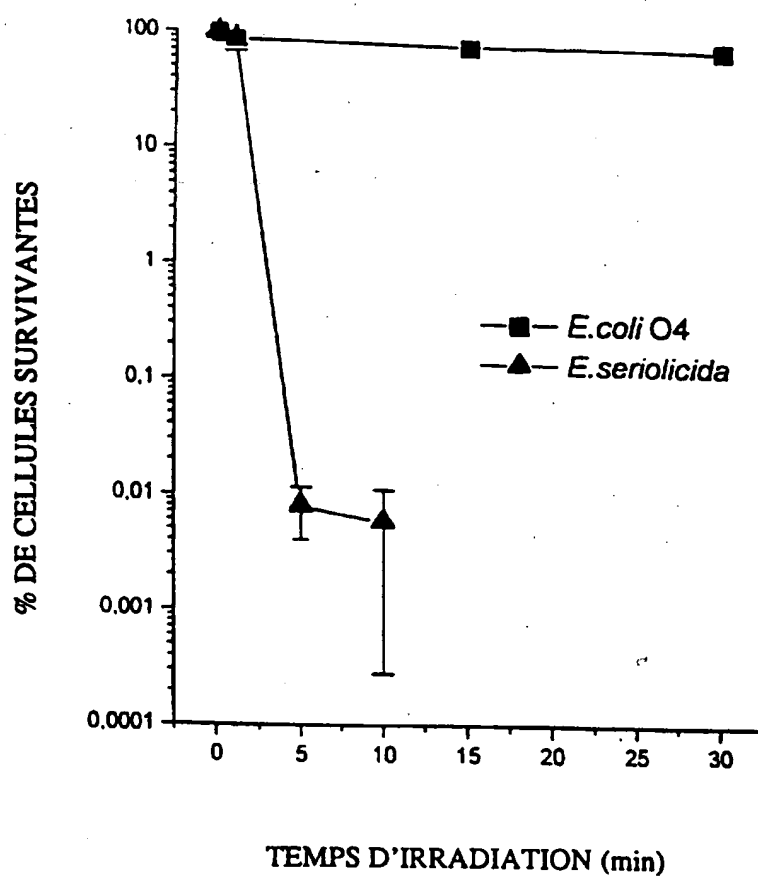
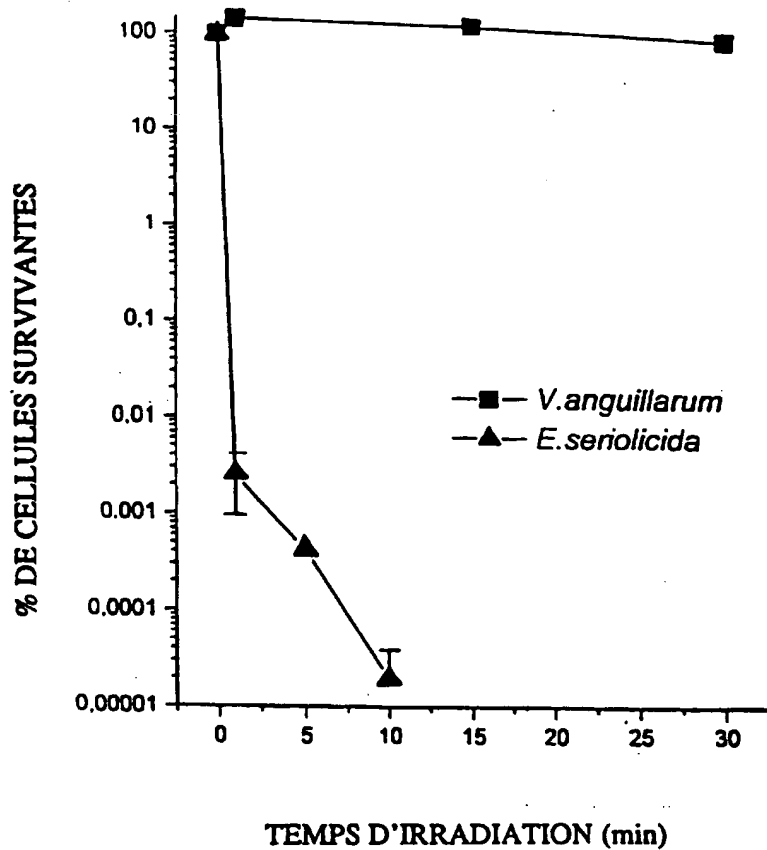


FIGURE 4

EFFET SUR DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES DE L'IRRADIATION  
PAR DE LA LUMIERE VISIBLE APRES 5 MINUTES D'INCUBATION A  
L'OBSCURITE EN PRESENCE DE Hp (10  $\mu$ g/ml)



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01096

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 A61K41/00 A61K31/40 A61K31/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| P,X        | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 7,<br>14 August 1995<br>Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 78493,<br>M. MERCHAT ET AL. 'PHOTOSENSITIZATION OF<br>BACTERIA TO VISIBLE LIGHT BY<br>MESO-SUBSTITUTED PORPHYRINS'<br>see abstract<br>& J. BRAZ. CHEM. SOC.,<br>vol. 6, no. 2, 1995<br>pages 123-125,<br>---<br>-/-- | 1-5,7,8,<br>11,12,15  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1995

Date of mailing of the international search report

04.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoff, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No

PCT/FR 95/01096

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim.No. |
| Y  | BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ.,<br>vol. 8, 1994<br>pages 68-74,<br>R. BONNETT ET AL. 'PHOTOBACTERICIDAL<br>FILMS BASED ON REGENERATED CELLULOSE'  | 1-4,7                 |
| X  | see the whole document<br>& FIRST NATIONAL CONFERENCE<br>"BIOTECHNOLOGY-TODAY AND TOMORROW",<br>May 1993 SOFIA,<br>----  | 5,6,8-15              |
| Y  | WO,A,93 00815 (COURTAULDS PLC) 21 January<br>1993<br>see abstract<br>see page 3, line 14 - page 4, line 15<br>see page 5, line 13 - page 6, line 29<br>see page 8, line 7 - page 9, line 1;<br>claims; figure 1; examples 1-3,13,14<br>----        | 1-15                  |
| Y  | BIOLOGIC EFFECTS OF LIGHT,<br>1993<br>pages 303-311,<br>T. BURROW ET AL. 'PDT SENSITISERS: A NEW<br>APPROACH TO CLINICAL APPLICATIONS'<br>see the whole document<br>----   | 1-15                  |
| Y  | JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND<br>PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 18, no. 1, 1993<br>pages 41-50,<br>D.T. CROKE ET AL. 'STRUCTURE-ACTIVITY<br>RELATIONSHIPS FOR DNA PHOTOCLEAVAGE BY<br>CATIONIC PORPHYRINS'<br>see the whole document<br>----                | 1-15                  |
| Y  | NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 20, no. 6, 1992<br>pages 1315-1319,<br>B.R. MUNSON ET AL. 'DNA INTERCALATION AND<br>PHOTOSENSITIZATION BY CATIONIC MESO<br>SUBSTITUTED PORPHYRINS'<br>see the whole document<br>----                               | 1-15                  |
| X  | WO,A,89 11277 (GEORGIA STATE UNIVERSITY<br>FOUNDATION) 30 November 1989<br>see abstract<br>see page 10, line 12 - line 20<br>see page 17, line 1 - line 8<br>see page 22, line 1 - page 23, line 9;<br>claims; figures 3A,3B; tables I-III<br>---- | 5,8,9                 |
|  | ----   |                       |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/FR 95/01096

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY,<br>vol. 3, no. 3, March 1993<br>pages 323-324,<br>R. BONNETT ET AL. 'PHOTOBACTERIAL<br>MATERIALS BASED ON PORPHYRINS AND<br>PHTALOCYANINES'<br>see the whole document<br>---  | 5,6,8,<br>11,12,15    |
| A          | PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 56, no. 4, 1992<br>pages 427-429,<br>C. KASTURI ET AL. 'INACTIVATION OF LAMBDA<br>PHAGE WITH 658nm LIGHT USING A DNA BINDING<br>PORPHYRIN SENSITIZER'<br>see the whole document<br>---   | 5,8,9                 |
| A          | PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 55, no. 1, 1992<br>pages 89-96,<br>Y. NITZAN ET AL. 'INACTIVATION OF<br>GRAM-NEGATIVE BACTERIA BY PHOTSENSITIZED<br>PORPHYRINS'<br>see the whole document<br>---   | 1-15                  |
| A          | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 19,<br>10 November 1986<br>Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 172135a,<br>'N,N',N'',N'''-TETRAKIS(1-ALKYLPYRIDINIUM-<br>4-YL) MESOPORPHINES AND THEIR BIOLOGICAL<br>ACTIVITY'<br>page 714; column 1;<br>see abstract<br>& ARM. KHIM. ZH.,<br>vol. 38, no. 6, 1985 RUSS.,<br>pages 391-396,<br>V.N. MADAKYAN ET AL. ----- | 1-15                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01096

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9300815                              | 21-01-93            | AU-A- 2222592              | 11-02-93            |
| WO-A-8911277                              | 30-11-89            | US-A- 5192788              | 09-03-93            |
|   |                     | AU-B- 3830689              | 12-12-89            |
|   |                     | US-A- 5109016              | 28-04-92            |
|   |                     | US-A- 5281616              | 25-01-94            |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dr. de Internationale No  
PCT/FR 95/01096

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 A61K41/00 A61K31/40 A61K31/44

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| P, X        | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 7,<br>14 Août 1995<br>Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 78493,<br>M. MERCHAT ET AL. 'PHOTOSENSITIZATION OF<br>BACTERIA TO VISIBLE LIGHT BY<br>MESO-SUBSTITUTED PORPHYRINS'<br>voir abrégé<br>& J. BRAZ. CHEM. SOC.,<br>vol. 6, no. 2, 1995<br>pages 123-125,<br>---<br>-/-- | 1-5, 7, 8,<br>11, 12, 15      |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04.01.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoff, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No  
PCT/FR 95/01096

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| Y   | BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ.,<br>vol. 8, 1994<br>pages 68-74,<br>R. BONNETT ET AL. 'PHOTOBACTERICIDAL<br>FILMS BASED ON REGENERATED CELLULOSE'  | 1-4,7                         |
| X   | voir le document en entier<br>& FIRST NATIONAL CONFERENCE<br>"BIOTECHNOLOGY-TODAY AND TOMORROW",<br>Mai 1993 SOFIA,<br>---   | 5,6,8-15                      |
| Y   | WO,A,93 00815 (COURTAULDS PLC) 21 Janvier<br>1993<br>voir abrégé<br>voir page 3, ligne 14 - page 4, ligne 15<br>voir page 5, ligne 13 - page 6, ligne 29<br>voir page 8, ligne 7 - page 9, ligne 1;<br>revendications; figure 1; exemples<br>1-3,13,14<br>---                  | 1-15                          |
| Y   | BIOLOGIC EFFECTS OF LIGHT,<br>1993<br>pages 303-311,<br>T. BURROW ET AL. 'PDT SENSITISERS: A NEW<br>APPROACH TO CLINICAL APPLICATIONS'<br>voir le document en entier<br>---  | 1-15                          |
| Y   | JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND<br>PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 18, no. 1, 1993<br>pages 41-50,<br>D.T. CROKE ET AL. 'STRUCTURE-ACTIVITY<br>RELATIONSHIPS FOR DNA PHOTOCLEAVAGE BY<br>CATIONIC PORPHYRINS'<br>voir le document en entier<br>---   | 1-15                          |
| Y   | NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 20, no. 6, 1992<br>pages 1315-1319,<br>B.R. MUNSON ET AL. 'DNA INTERCALATION AND<br>PHOTOSENSITIZATION BY CATIONIC MESO<br>SUBSTITUTED PORPHYRINS'<br>voir le document en entier<br>---  | 1-15                          |
| X   | WO,A,89 11277 (GEORGIA STATE UNIVERSITY<br>FOUNDATION) 30 Novembre 1989<br>voir abrégé<br>voir page 10, ligne 12 - ligne 20<br>voir page 17, ligne 1 - ligne 8<br>voir page 22, ligne 1 - page 23, ligne 9;<br>revendications; figures 3A,3B; tableaux<br>I-III<br>---<br>-/-- | 5,8,9                         |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale Nq  
PCT/FR 95/01096

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A         | JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY,<br>vol. 3, no. 3, Mars 1993<br>pages 323-324,<br>R. BONNETT ET AL. 'PHOTOBACTERIAL<br>MATERIALS BASED ON PORPHYRINS AND<br>PHTALOCYANINES'<br>voir le document en entier<br>---  | 5,6,8,<br>11,12,15            |
| A         | PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 56, no. 4, 1992<br>pages 427-429,<br>C. KASTURI ET AL. 'INACTIVATION OF LAMBDA<br>PHAGE WITH 658nm LIGHT USING A DNA BINDING<br>PORPHYRIN SENSITIZER'<br>voir le document en entier<br>---  | 5,8,9                         |
| A         | PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY,<br>vol. 55, no. 1, 1992<br>pages 89-96,<br>Y. NITZAN ET AL. 'INACTIVATION OF<br>GRAM-NEGATIVE BACTERIA BY PHOTSENSITIZED<br>PORPHYRINS'<br>voir le document en entier<br>---  | 1-15                          |
| A         | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 19,<br>10 Novembre 1986<br>Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 172135a,<br>'N,N',N'',N'''-TETRAKIS(1-ALKYLPYRIDINIUM-<br>4-YL) MESOPORPHINES AND THEIR BIOLOGICAL<br>ACTIVITY'<br>page 714; colonne 1;<br>voir abrégé<br>& ARM. KHIM. ZH.,<br>vol. 38, no. 6, 1985 RUSS.,<br>pages 391-396,<br>V.N. MADAKYAN ET AL.<br>----- | 1-15                          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document internationale No

PCT/FR 95/01096

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-9300815                                    | 21-01-93               | AU-A- 2222592                           | 11-02-93               |
| WO-A-8911277                                    | 30-11-89               | US-A- 5192788                           | 09-03-93               |
|   |                        | AU-B- 3830689                           | 12-12-89               |
|   |                        | US-A- 5109016                           | 28-04-92               |
|   |                        | US-A- 5281616                           | 25-01-94               |